Standar Nasional Indonesia

SNI 01-2329-1991

Metode pengujian mikrobiologi produk perikanan - Penentuan clostridium perfriengens

ICS

Badan Standardisasi Nasional BSN

Daftar isi

Metode pengujian mikrobiologi produk perikanan - Penentuan clostridium perfriengens

0 Pendahuluan

Keracunan makanan karena *C. perfringens* dapat terjadi apabila makanan seperti daging dan unggas dimasak dan disimpan pada suhu refrigerasi yang kurang baik sebelum disajikan. Kadar oxigen yang diturunkan selama proses pemasakan dapat menyebabkan pertumbuhan clostriatia rasa sakit terjadi selama 5 - 18 jam setelah mengkonsumsi makanan, dengan kejang pada intestinal yang intensif, kembung dan diare, mual dan muntah-muntah jarang terjadi.

Clostridium perfringens dalam jumlah sedikit bukan hal yang tidak umum dijumpai pada daging, unggas, sup dan saus yang didehidrasi, sayuran mentah, bumbu-bumbu dan lain-lain. Karena spora dari beberapa strain organisma ini dapat tahan sampai 100°C selama lebih dari 1 jam, kehadirannya dalam makanan tidak dapat dihindari. Akan tetapi, spora dan organisma yang dapat bertahan terhadap proses pemanasan dapat bertunas dan tumbuh dengan cepat dalam bahan makanan yang telah dimasak dan disimpan dengan suhu refrigerasi yang kurang. Oleh sebab itu adanya *C. perfringens* dalam jumlah yang banyak di dalam makanan menunjukkan adanya penanganan yang salah (kurang tepat). Pada kasus keracunan makanan, ditemukannya organisma dengan jumlah ratusan atau ribuan atau lebih per gram makanan menguatkan diagnosa adanya kasus keracunan yang disebabkan oleh *C. perfringens* ketika telah dibuktikan secara klinis dan epidemiologi.

Ketahanan hidup *C. perfringens* akan berkurang apabila makanan didinginkan atau disimpan dalam suhu refrigerasi dalam waktu yang lama kecuali adanya hal-hal lain yang dapat mempertahankan kehidupannya. Kehilangan daya tahan hidup ini menyebabkan sulitnya menentukan *C. perfringens* sebagai akibat dari kasus keracunan. Apabila makanan tersangka disimpan dalam suhu rendah selama lebih dari 1 atau 2 hari tanpa penanganan khusus yang diterangkan di bawah ini, metode *alpha-toxin* indicator dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah maksimum *C. perfringens* yang ada dalam makanan tersangka.

1 Pengambilan contoh

Ambil seluruh bagian makanan (roti bakar, ayam, kaldu kental dan lain-lain) atau ambil contoh yang dapat mewakili keseluruhan makanan sebanyak 100 g dari setiap bagian makanan, sebab kontaminasi dapat tersebar dengan tak merata.

2 Penyimpanan dan transportasi contoh

2.1 Bawa dan periksa contoh tanpa membekukan, apabila mungkin, dan simpan pada suhu ± 10°C sampai saat pemeriksaan. Apabila analisa tidak dapat dilaksanakan dalam

jangka waktu 8 jam, contoh harus dikirimkan dalam jarak jauh ke laboratorium untuk dianalisa, contoh harus ditangani dengan buffered 20% glycerin steril dan segera simpan pada suhu -55 sampai -90°F (—48,3 s/d -67,8°C) dan bawa ke laboratorium dengan es kering seperti diterangkan di bawah ini.

2.2 Penyiapan contoh untuk penyimpanan dan transportasi.

Dengan menggunakan teknik-teknik aseptis, homogenkan 25 g porsi contoh (sepotong daging dan lain-lain) dengan 0,1% peptone water dan pindahkan 50 ml larutan homogen tersebut ke wadah steril (150 ml) seperti *whirl-pak bag*. Tambahkan 50 ml (atau volume yang setara) larutan *buffered glycerin salt*.

Contoh dalam bentuk cairan seperti saus atau kaldu dapat ditangani tanpa proses homogenasi.

2.3 Penyimpanan contoh.

Simpan larutan contoh-glycerin yang telah homogen segera pada suhu dalam freezer bersuhu rendah sehingga pembekuan dapat terjadi secepat mungkin. Pertahankan suhu ini sampai analisa contoh dimulai. Lelehkan contoh dan lakukan pengujian (suhu freezer : -48,3°C s/d 67,8°C).

2.4 Transportasi contoh.

Apabila contoh harus dibawa dengan jarak jauh ke laboratorium, ikuti prosedur di atas dan tempatkan larutan homogen contoh beku dengan es kering untuk mempertahankan suhu serendah mungkin. Yakinkan bahwa wadah tidak tembus gas CO_2 , sebab penyerapan CO2 oleh contoh dapat menurunkan pH sehingga menurunkan daya tahan hidup *C. perfringens.* Pindahkan contoh untuk disimpan pada suhu di atas segera setelah diterima dan simpan dalam suhu ini sampai saat pengujian, disarankan hanya untuk beberapa hari.

3 Metode pembiakan untuk penghitungan dan konfirmasi clostridium perfingen dalam makanan.

3.1 Peralatan

3.1.1 Pipet

3.1.2 *Colony counter* - Quebec atau yang setara.

3.1.3 Blender dengan kecepatan tinggi - dengan 2 kecepatan dan kecepatan rendah sebesar 5000 rpm.

3.1.4 *Anaerobic jar—BBL Gas Pack Jar* yang dilengkapi dengan Gas Pack H + CO_2 generator;

Anerob Jar dengan pengganti udara dengan N_2 murni atau 90% Na_2 + 10% CO.

3.1.5 Inkubator, 35°C.

3.2 Media dan *reagensia*.

3.2.1 *Chopped liver broth atau modified cooked meat medium.*

3.2.2 *Tryptose-sulfite-cycloserine* (TSC) agar.

3.2.3 *Egg yolk emusion*. (lihat TSC agar).
3.2.4 *Media Buffered motility-nitrate*.
3.2.5 *Media Lactose--gelatine*.
3.2.6 *CP sporulation broth*.
3.2.7 Media *Polypeptone-yeast extract* (PY).
3.2.8 Media *fluid thioglycollate*.
3.2.9 *Diluen peptone water*.
3.2.10 *Reagensia pewarnaan gram*.
3.2.11 *Reagensia* tes.
3.2.12 Larutan *Buffered glycerine*-NaCl.

3.3 Prosedur pembiakan dan isolasi.

3.3.1 Siapkan lapisan tipis larutan contoh; buat pewarnaan dengan Metoda Gram, dan periksa adanya bakteri berbentuk lonjong, Gram-negatif.
3.3.2 Metoda *Plate Count* untuk *C. Perfringens* yang masih hidup.
3.3.2.1 Secara aseptis, timbang 50 g contoh ke dalam wadah blender steril. Tambahkan 450 ml larutan peptone water. Homogenasi selama 1-2 menit dengan kecepatan 8.000-10.000. Usahakan memperoleh larutan yang homogen dengan sedikit mungkin kontak dengan udara.
3.3.2.2 Dengan menggunakan larutan pengenceran 1 : 10 di atas, buat pengenceran sampai 10^{-6} . Kocok perlahan-lahan hingga homogen.
3.3.2.3 Tuang 6-7 ml TSC agar tanpa kuning telur ke dalam petridish. Ketika agar membeku, pindahkan 1 ml larutan contoh secara aseptis ke atas bagian tengah agar. Buat *duplo* tuangkan lagi ke atasnya, 15 ml TSC agar tanpa kuning telur dan aduk dengan memutar petri secara hati-hati. Panaskan petri pada suhu 35-37°C sebelumnya, untuk mendapatkan campuran inokulum dan agar yang homogen.
3.3.2.4 Alternatif metode yang baik untuk makanan yang mengandung jenis organisma yang mereduksi sulfit lainnya adalah dengan meratakan 0,1 ml tiap-tiap larutan pengenceran steril dengan glass rod speader steril ke seluruh permukaan TSC agar beku yang mengandung emulsi kuning telur. Setelah inokulum diabsorbsi (± 15 menit), tuangkan ke atasnya 10 ml TSC agar tanpa emulsi kuning telur.
3.3.2.5 Apabila agar telah membeku, letakkan petridish dengan tutup menghadap ke atas di dalam anaerobic Jar. Buat kondisi anaerob dan letakkan wadah tersebut pada suhu 35°C diinkubasi selama 20-24 jam (TSC agar yang mengandung kuning telur harus diinkubasi selama 24 jam).
3.3.2.6 Setelah inkubasi, pindahkan petridish dari anaerobic jar dan periksa dengan mikroskop adanya pertumbuhan dan koloni berwarna hitam. Pilih petri yang mengandung 20-200 koloni berwarna hitam. *C. Perfringens* di medium kuning telur biasanya berwarna hitam dengan zone putih yang tidak jelas berukur 2-4 mm disekeliling koloni sebagai akibat aktivitas lecithinase. Dengan menggunakan Quebec Colony Counter dan menggunakan dasar putih, hitung koloni hitam dan nyatakan

sebagai clostridial/gram makanan.

3.3.2.7 Ambil koloni untuk tes konfirmasi.
Pilih petri yang mengandung 20-200 koloni hitam.

3.3.3 Siapkan chopped liver broth atau cooked meat broth dengan memanaskan hingga mendidih selama 10 menit dalam air atau uap air (dengan mengukus) dan dinginkan segera tanpa agitasi. Inokulasi beberapa tabung yang masing-masing berisi 2 ml larutan homogen dari pengenceran 1 : 10 sebagai pendukung prosedur plating. Inkubasi tabung-tabung ini pada suhu 35°C selama 24-28 jam dalam inkubator standar. Ini dapat diabaikan apabila metoda plate count memberikan hasil positif.

3.4 Konfirmasi *C. perfringen*.

3.4.1 Pilih 10 koloni tersangka dari TSC atau TSC *egg yolk* agar dan inokulasi tiap-tiap koloni ke dalam tabung berisi cairan *thioglycollate broth* segar yang telah di deaerasi dan didinginkan.

3.4.2 Inkubasi dalam inkubator standar pada suhu 35°C selama 18-24 jam.

3.4.3 Periksa setiap kultur dengan pewarnaan gram dan periksa kemurniaan dari tiap kultur *C. perfriengens* adalah *bacillus* berbentuk pendek, tebal, Gram-positif. Apabila terjadi kontaminasi, goreskan kultur tersebut ke TSC agar yang mengandung *egg yolk* dan inkubasi pada *anaerobic jar* 24 jam dengan suhu 35°C. Permukaan koloni *C. perfriengens* berwarna abu-abu kekuningan dengan zone berwarna kabur sebesar 2-4 mm akibat aktivitas *Lecithi-nase.* Prosedur ini juga digunakan untuk isolasi *C. perfringens* dari *chopped liver broth* (3.3.3 di atas) apabila organisma tidak di deteksi dengan direct plating pada TSC agar.

3.4.4 Inokulasi media *buffered motility nitrate* dan *lactose gelatin* dengan kultur murni dari cairan thioglycollate sebanyak 1 jarum inokulasi berdiameter 2 mm penuh atau sebagian dengan isolasi koloni dari TSC agar. Inkubasi selama 24 jam pada 35°C.

3.4.5 *Inokulasi sporalation brith* dengan 1 ml cairan *kultur thioglycollate* dan inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

3.4.6 *C. perfriengens* tidak bergerak. Periksa tabung berisi *buffered motility nitrate* medium dengan terlihatnya sinar transmisi pada sekitar tusukkan. Organisma non-motile (tidak bergerak) memberikan pertumbuhan hanya pada sekitar tusukkan. Organisma bergerak memproduksi pertumbuhan menyebar ke dalam medium menjauhi tusukkan.

3.4.7 *C. perfringens* mereduksi nitrat menjadi nitrit. Pengujian reduksi nitrat dengan menambahkan 0,5 ml reagensia A dan 0,2 ml reagensia B ke dalam kultur pada *buffered motility nitrat* medium. Adanya warna oranye yang terbentuk dalam waktu 1,5 menit

menunjukkan adanya nitrit. Apabila tidak terdapat adanya warna, tambahkan sedikit bubuk seng dan biarkan beberapa menit. Tes negatif dengan penambahan seng menunjukkan bahwa nitrat telah direduksi secara sempurna. Tes positif dengan penambahan seng menunjukkan bahwa organisma tidak dapat mereduksi nitrat.

3.4.8 Periksa kultur lactose-gelatin medium terhadap adanya gas dan perubahan warna dari merah ke kuning yang menunjukkan adanya asam. Dinginkan tabung selama 1 jam pada suhu 5°C dan periksa adanya pencairan/pelelehan gelatin. Apabila medium membentuk koloida, reinkubasi selama 24 jam lagi pada suhu 35°C dan periksa kembali terjadinya pelelehan gelatin.

3.4.9 Buat *Gram-strained smear* dari *sporulation broth* dan periksa dengan mikroskop terdapatnya spora. Simpan kultur berspora tersebut pada suhu 4°C apabila pengujian selanjutnya diperlukan.

3.4.10 Tabulasi hasilnya, *C. perfringens* dapat diidentifikasi sebagai *bacillus non-motile*, Gram-positif, yang memberikan koloni hitam pada TSC agar, mereduksi nitrat menjadi nitrit, memproduksi asam dan gas dari laktosa, dan mencairkan gelatin dalam waktu 48 jam. Beberapa strain *C. perfringens* memberikan sporulasi dan reaksi *lacithinase* yang lemah pada TSC agar yang mengandung kuning telur. Organisma tersangka yang tidak memberikan kriteria ini harus diuji lagi (3.4.14).

3.4.11 Buat isolasi baru dari kultur yang tidak memberikan kriteria di atas (tidak bergerak, mereduksi nitrat, memfermentasi laktosa dalam asam dan gas, dan mencairkan gelatin dalam jangka waktu 48 jam) ke dalam cairan medium *thioglycollate*. Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam, buat *Gram stained smear* dan periksa terhadap kemurnian dan morfologi sel.

3.4.12 Inokulasi 1 tabung yang berisi PY medium segar yang didehidrasi dan yang mengandung 1% *salicin* dan 1 tabung yang mengandung 1% *raffinose* dengan 0,1 ml larutan kultur murni dari *thioglycollate*.

3.4.13 Inkubasi media pada suhu 35°C selama 24 jam dan periksa PY *salicin* terhadap asam dan gas. Uji terhadap asam dengan memindahkan 1,0 ml kultur ke tabung reaksi atau spot plate dan tambahkan 1 atau 2 tetes 0,04% *phenol red*. Warna kuning menunjukkan adanya asam dan *salicin*. Reinkubasi media selama 48 jam dan uji terhadap adanya asam. Salicin di fermentasi dengan cepat dengan membentuk asam dan gas oleh mikroorganisma yang mempunya spesies berdekatan dengan *C. perfringens*, tetapi bukan *C. perfringens*. Asam biasanya diproduksi dari *raffinose* dalam waktu 3 hari oleh *C. perfringens* tetapi tidak diproduksi oleh mikroorganisma yang mempunyai spesies dekat dengan C. perfringens.

3.4.14 Beberapa spesies *clostridium* yang biasanya di isolasi dari makanan yang

mempunyai karakteristik yang dapat dibedakan dari *C. perfringens* :

3.4.14.1 *C. perfringens*: *(IC. berati)* : sel berbentuk kecil memanjang dalam gabungan berbentuk filamen dengan badan berbentuk *globular* (bundar) besar pada *cooked meat* atau media lain yang mengandung karbohidrat; tidak ada nitrat atau ada tetapi lemah setelah 18 jam; memproduksi *lacithinase* yang sangat lemah, dan tidak pernah mencairkan gelatin.

3.4.14.2 *C. absonum (C. sardineonsis)*; kultur memberikan pergerakkan yang lemah; mencairkan gelatin dengan perlahan; memproduksi *lacithinase* dengan kuat; ada atau memproduksi nitrit dengan lemah setelah 18 jam.

3.4.14.3 *C. celatum (filamentosa)*; seperti *C. perfringens* kecuali sel berbentuk besar pada bagian dasar tabung; dan biasanya tumbuh sangat lambat. Dilaporkan bahwa semua isolasi ini berasal dari feces.

3.4.15 Hitung jumlah *C. perfringens* dalam contoh berdasarkan pada pers entasi (%) koloni yang diuji yang mana telah dikonfirmasikan sebagai *C. perfringens* (Contoh : Apabila rata-rata *plate count* dari pengenceran 10^{-4} adalah 85 dan 8 dari 10 koloni yang diuji adalah *C. perfringens* jumlah *C. perfringens* per gram makanan adalah 85 x 8/10 x 10.000 = 680.000).
Catatan : Faktor pengenceran pada petri yang mengandung kuning telur adalah 10 x lipat lebih tinggi dari pada pengenceran contoh sebab hanya 0,1 ml yang ditanam.

3.5 Metode *Alpha--Toxin* untuk memperkirakan populasi *C. perfringens* pada makanan.
Sel legelatif dari *C. perfringens* menurun dengan cepat apabila disimpan dalam refrigerator atau dibekukan. Untuk memperoleh jumlah mikroorganisma hidup secara akurat, dan untuk mendapatkan hubungannya dengan kasus keracunan, contoh analisa harus diperiksa langsung tanpa penyimpanan pada suhu rendah, kecuali ada perlakuan-perlakuan khusus untuk mempertahankan kehidupannya (lihat cara penyimpanan dan transportasi contoh). Akan tetapi, alpha-toxin yang diproduksi selama *C. perfringens* tumbuh dalam makanan adalah cukup stabil. Produksi alpha-toxin oleh *C. perfringens* biasanya sebanding dengan jumlah sel metabolisma. Ini dapat di ekstraksi dan dihitung untuk mendapatkan perkiraan maksimum populasi organisma ini dalam makanan. Metode ini sangat cocok untuk menentukan besarnya pertumbuhan *C. perfringens* dalam makanan yang telah dibekukan atau disimpan dalam refrigerator dalam waktu yang lama dan yang mana nilai *plate count* menjadi rendah. Metode ini sangat sesuai untuk contoh yang telah dibekukan untuk penyimpanan dan selama transportasi ke laboratorium.

3.5.1 Peralatan

3.5.1.1 *Seitz filter*, kapasitas 250 ml, *sterilizing filter pads*.
3.5.1.2 *Sorvall, omni-mixer* atau *Waring blender*.
3.5.1.3 *Centrifuge*, kecepatan tinggi.

3.5.1.4 *Rubber tubbing*, 1/4 x 1/6" dan 5/16 x 1/16".
3.5.1.5 *Dialysis tubing*, 3/4" diameter.
3.5.1.6 Kertas saring, Whatman no. 31 atau sejenis.
3.5.1.7 Penyaring teh atau sejenisnya.
3.5.1.8 *Refrigerator*, 4°C.
3.5.1.9 Inkubator, 35°C.
3.5.1.10 *Stainless stell tubing*, 3 mm, berdinding tipis.
3.5.1.11 Tabung vakum, 1 liter.
3.5.1.12 Corong, 75 dan 100 mm.
3.5.1.13 *Beaker.*
3.5.1.14 Pipet Pasteur.
3.5.1.15 Gelas ukuran.
3.5.1.16 Botol 6 oz.
3.5.1.17 Tabung sentrifugal.
3.5.1.18 Tabung reaksi steril.
3.5.1.19 *Petridish*.
3.5.1.20 Pipet steril.

3.5.2 Media dan reagensi

3.5.2.1 Hk PES (N-2-*Hydruxyethylpiperazine* N-2; *ethane sulfonic acid*, grade A) *buffered salt solution*.
3.5.2.2 *Polyethylene glycol*, 20.000 M.W.
3.5.2.3 *Puriffied agar* (*difco*) atau sejenis.
3.5.2.4 Telur segar.
3.5.2.5 Sel darah merah manusia (*outdated packed cells* atau seluruh darah dapat dipergunakan).
3.5.2.6 *Clostridium perfringens* type A diagnostic antiserum.
3.5.2.7 Larutan 0,85% NaCl steril.
3.5.2.8 Larutan *Lecithovitellin*.
3.5.2.9 Saline agar base.

3.5.3 Penyiapan hemolysin indicator plate.

3.5.3.1 Cuci *packed human red blood cells* 3 kali dengan mencampur 3 atau 4 bagian volume 0,85% NaCl steril dan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan rendah (2.500 rpm).
3.5.3.2 Buat suspensi sel-sel darah merah yang telah dicuci dengan perbandingan volume yang sama dengan larutan NaCl 0,85% steril.
3.5.3.3 Tambahkan 11 ml sel-sel darah merah yang telah dicuci ke dalam 100 ml *saline* agar *base* pada suhu 50°C; aduk hingga-homogen dan pindahkan 7 ml ke dalam *petridish*.
3.5.3.4 Keringkan hingga beku agar dalam petri tersebut pada suhu ruang dan simpan pada

suhu 4°C.

3.5.3.5 Sebelum digunakan, buat sumur-sumur dengan tabung berdinding tipis dari metal steril yang sebelumnya telah dibuat vakum isinya dan yang berdiameter 3 mm, dengan jalan menusukkan tabung metal tersebut ke permukaan agar. Buat jarak antara sumur 3 cm dan jarak sumur dengan batas pinggir 2 cm, dengan menggunakan template (talenan).

3.5.3.6 Buat 2 sumur tambahan, berjarak 3 cm dekat titik tengah *petridish*.

3.5.4 Prosedur untuk ekstraksi dan pengenceran.

3.5.4.1 Homogenasi 25 g makanan (hindarkan lemak) dengan 100 ml HEPES - saline dalam *waring blender* atau *Omni mixer* selama 2 menit dengan kecepatan tinggi.

3.5.4.2 Sentrifugasi larutan homogen tersebut selama 20 menit pada kecepatan tinggi (20.000 x g) pada suhu 5°C. Tuangkan larutan jernihnya dan saring melalui saringan teh atau yang sejenis atau menghilangkan lemak. Buang endapannya.

3.5.4.3 Sentrifugasi lagi larutan jernihnya, apabila perlu, untuk menjernihkan lagi. Apabila larutan jernih tersebut mengandung kadar lemak yang tinggi, yang terlihat dengan adanya endapan, dinginkan larutan jernih tersebut selama 1—2 jam pada suhu 5°C dan saring melalui kertas saring kasar (*whatman* No. 31). Prosedur ini disarankan untuk digunakan untuk setiap ekstrak yang telah disentrifugal pada suhu ruang.

3.5.4.4 Tambahkan 20 ml larutan NaCl 0,85% steril ke dalam 250 ml gabungan *seitz filter*. Biarkan kertas saring tersebut terendam selama 10 menit, kencangkan gabungan/sambungan kertas saring untuk memisahkan kotoran-kotoran yang menyebabkan larutan menjadi tidak murni.

3.5.4.5 Buang salien dan filter-sterilisasi larutan jernih dengan tekanan minimum. (Penggunaan jarum hipodermik berukuran 18 yang dimasukk2n ke dalam dinding tabung ke sumber vacuum dapat untuk mencegah teka,,tan vacuum yang terlalu tinggi pada kertas saring selama penyaringan).

3.5.4.6 Bilas kertas saring dengan menambahkan 10 ml NaCl 0,85% untuk memisahkan residu dari alpha-toxin.

3.5.4.7 Rendam tabung dialisa dengan panjang 3 foot (± 63 cm) di dalam aquadest selama 30 menit.

3.5.4.8 Ikat salah satu ujungnya, periksa terhadap adanya kebocoran (lubang), dan bilas bagian dalamnya dengan *saline* steril 2 kali.

3.5.4.9 Pindahkan ekstrak makanan yang telah disaring dengan *seitz filter* ke dalam kantung dialisa, dan pekatkan hingga 5—10 ml dengan dialisa terhadap 400 ml *polyethylene glycol* 20-30% (Apabila ekstrak terlalu pekat sehingga mendekati kering, larutkan toksin dengan dialisa terhadap *saline* selama 2 jam pada suhu 4°C).

3.5.4.10 Bilas bagian luar kantung dengan air kran untuk menghilangka *polyethylene glycol*, dan kumpulkan ekstrak pekat tersebut pada tabung steril. Apabila perlu, tambahkan *saline* steril secukupnya ke dalam kantung untuk melarutkan ekstrak pekat yang ada.

3.5.5 Pengujian Toksin.

3.5.5.1 Sesuaikan volume ekstrak pekat hingga 5—7 ml.

3.5.5.2 Siapkan 10 tabung reaksi steril (13 x 100 ml), dan tambahkan 0,5 ml *saline* steril (pH 7,0) ke semua tabung kecuali pada tabung pertama dan terakhir.

3.5.5.3 Tambahkan 0,5 ml ekstrak pada tabung pertama dan kedua.

3.5.5.4 Campur hingga homogen, *saline* dan ekstrak pada tabung kedua, dan pindahkan 0,5 ml ke tabung ketiga, aduk dan pindahkan ke tabung berikutnya, dan seterusnya untuk mendapatkan pengenceran 1:2 dengan kelipatan dua melalui 1 : 256. Ganti pipet sehabis digunakan pada 3 tabung.

3.5.5.5 Campur 0,25 ml ekstrak, 0,25 ml *saline* dan 0,1 ml larutan pengenceran 1 : 10 dari diagnostic antitoxin *C. perfringens* jenis A pada tabung yang terakhir untuk menentukan apakah hemolisa atau aktivitas lecithinase diakibatkan oleh alphatoxin.

3.5.5.6 Siapkan pipet yang berujung baik dengan membakar ujung pipet Pasteur pada api Bunsen.

3.5.5.7 Isi 1 sumur bagian pinggir dengan setiap larutan ekstrak, dimulai dari pengenceran tertinggi, pada *hemolysin indicator plate* duplikat.

3.5.5.8 Isi satu sumur yang berada di tengah-tengah dari tiap-tiap *petridish* dengan campuran ekstrak-antitoxin dan lainnya dengan larutan *saline*.

3.5.5.9 Setelah semua petri siap, tambahkan 0,5 ml *lecithovitellin* (LV) *solution* pada sisa larutan ekstrak yang telah diencerkan pada setiap tabung.

3.5.5.10 Letakkan petri dalam tas plastik untuk menghindari pengeringan, dan inkubasi petri dan tabung pada suhu 35°C selama 24 jam.

3.5.6 Memperkirakan pertumbuhan C. perfringens sebelumnya.

3.5.6.1 Setelah inkubasi, letakkan petri pada refrigerator selama 2 jam, dan ukur adanya zone hemolitik (lebar dari zone dihitung dari tepi sumur). Tiga pengenceran terakhir sebelum titik akhir harus memberikan pengurangan zone sekitar 1 mm untuk setiap pengenceran dengan kelipatan 2; yaitu : 4 mm, 3 mm, 2 mm dan 1 mm. Pengenceran terakhir dari seri ini adalah titik akhir dari pengenceran.

3.5.6.2 Perhatikan adanya aktivitas *lecithinase* yang ditunjukkan dengan adanya larutan LV yang jernih/transparan kabur. Pengenceran 2 kali lipat. Maksimum (+ 4) reaksi terlihat sebagai pelikel putih yang tebal dari lemak di atas larutan yang terang. Aktivitas ini menurun dengan makin tingginya pengenceran menjadi larutan yang kabur tanpa adanya reaksi pelikel (+ 1). Ini merupakan titik akhir dari tes LV. Campuran antitoxin ekstrak harus negatif pada tes HI plate dan LV.

3.5.6.3 Untuk memperkirakan populasi *C. perfringens*, bandingkan titer alpha-toxin yang ada pada makanan dengan data pada tabel ini. Apabila terjadi perbedaan antara titer dan ke dua pengujian, hasil yang diperoleh dengan HI plate lebih dapat dipercaya dan harus digunakan.

Tabel 1. Korelasi antara populasi *Clostridium perfringens* dan jumlah alpha-toxin yang diproduksi dalam makanan

Titer alpha-toxina		Perkiraan C. perfringens populasi/gram (10^6)
HI plate	Tes LV	
Tidak diencerkan		1,2[b]
1 : 2	Tidak diencerkan	2,5
1 : 4	1 : 2	6,5
1 : 8	1 : 4	9,5
1 : 16	1 : 8	25
1 : 32	1 : 16	55
1 : 64	1 : 32	80
1 : 128	1 : 128	150
1 : 256	1 : 256	210

a. Pengenceran yang menghasilkan 1 mm *cone* hemolisa pada HI *plate* atau reaksi 1+ pada tes LV.
b. Berdasarkan pada penghitungan bakteri yang hidup dengan 6 *strain*.

Lampiran 1
Media pembiakan

Beberapa dari formulasi media tercantum dalam lampiran ini tersedia secara komersial baik dalam bentuk dehidrasi atau yang langsung digunakan. Kecuali adanya ketentuan-ketentuan yang diperlukan, formulasi komersil tersebut telah dibuktikan baik untuk digunakan pada metoda pengujian yang tercantum di atas. Akan tetapi instruksi untuk penyiapan media harus benar-benar ditaati.

Beberapa formulasi komersial berbeda dengan formulasi aslinya, sebab (1) adanya beberapa modifikasi yang telah dikembangkan atau (2) pembuat media telah menemukan bahwa beberapa perbedaan konsentrasi dan jenis bahan, kontrol pH yang lebih baik, produktivifas, ham batan dan sebagainya dapat dipertahankan. Perubahan-perubahan ini biasanya mendorong kegunaan dari media untuk tujuan-tujuan tertentu. Perubahan-perubahan formula telah dibuktikan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisma jika dibandingkan dengan formula aslinya. Selain itu, pengawasan terhadap kualitas dari media komersial memerlukan pengujian-pengujian untuk produktivitas, hambatan dan sebagainya untuk setiap lot media dengan pengujian kontrol mikroorganisma terpilih secara hati-hati. Oleh sebab itu kualitas dari media dehidrasi pada umumnya mem-punyai tingkat yang lebih baik dibandingkan dengan media yang dibuat di laboratorium.

Merupakan suatu hal yang harus dilakukan untuk menginokulasi 1 set mikroorganisma kontrol pada setiap lot media. Pelaksanaan ini sangat disarankan terutama pada laboratorium yang berhubungan dengan riset dan pengembangan metode analisa yang tergantung pada karakteristik biokimia spesifik dari mikroorganisma.

1 Chopped liver broth

Fresh beef liver	500 g
Aquadest	800 ml
Leptone	10g
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	1 g
Soluble starch	1 g

Hancurkan/tumbuk hati sampai menjadi cairan. Panaskan hingga titik didih dan biarkan mendidih pelan selama 1 jam. Dinginkan dan sesuaikan pH sampai 7,0 dan didihkan 10 menit. Saring dengan *cheescloth* dan tekan hingga air ke luar semua. Pada *broth*, tambahkan *peptone*, K_2HPO_4, dan *soluble starch*. Sesuaikan hingga pH 7,0. Buat hingga volume 1 liter dengan *aquadest*. Saring dengan kertas saring kasar. (Pada tahap ini, *broth* dan daging/mat dapat disimpan terpisah dengan freezer untuk penggunaan selanjutnya). Ke dalam tabung reaksi 18 atau 20 x 150 mm, masukkan *chopped liver* sampai ketinggian 0,5 - 1 inchi dan 10 - 12 ml *broth*. *Autoclave* 121°C, 20 menit.

2 *Cooked meat* media modifikasi

(a) *Cooked meat* medium (medium dehidrasi tersedia secara komersial).

Beef heart	454,0 g
Proteose peptone	20,0 g
Desetrose peptone	2,0 g
Sodium chloride	5,0 g

(b) *Diluen* (tidak tersedia secara komersial).

Typticase	10,0 g
Sodium thioglycollate	1,0 g
Soluble starch	1,0 g

3 Media *fluid thioglycollate*

L-cystine	0,5 g
Agar, granulated (kering)	0,75 g
Sodium chloride	2,5 g
Dextrose	5,0 g
Yeast extract (larut dalam air)	5 g
Pancreatic digest of casein	15 g
Sodium thioglycollate (atau thioglycollic acid)	0,5 g
Reaszurin, sodium solution (1 : 1000) segar	1 ml
Aquadest	1000 ml

Campur *L-cystine*, *sodium chloride, dextrose, water-soluble yeast*, dan *pancreatic digest of casein* dengan 1000 ml air, dan panaskan dalam *Arnold steamer bath*. Larutkan larutan *sodium thioglycollate* atau *thioglycollic acid*, dan jika perlu, sesuaikan pH larutan dengan sodium hydroxid 1 N sehingga setelah sterilisasi pH menjadi 7,1 ± 0,2. Tambahkan larutan *reaszurin sodium*, campur, tempatkan medium dalam tabung yang cocok, dan sterilisasi dengan *auto clave* 121°C, 20 menit.

Fluid thioglycollate medium. BBL, *Ditco, Oxoid*. Pindahkan tiap-tiap 10 ml ke tabung-tabung reaksi bertutup 150 x 16 mm. Sterilisasi 121°C, 15 menit dan masak dengan cepat. pH akhir 7,1 ± 0,1.

4 Media lactose - gelatin

Tryptose	15 g
Yeast extract	10 g
Lactose	10g
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	5 g
Phenol red (sebagai larutan)	0,05 g
Gelatin	120 g
Aquadest	1 liter

Sesuaikan pH hingga 7,5 ± 0,2 sebelum penambahan lactose dan phenol red. Pindahkan

tiap 10 ml ke dalam tabung reaksi bertutup 150 x 16 mm dan sterilisasi dengan suhu 121°C selama 15 menit.

5 *Motility-Nitrate medium-Buffered* (Untuk *C. Perfringens*)

Beef extract	3 g
Peptone (Difco)	5 g
Potassium nitrate (KNO_3)	5 g
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	2,5 g
Agar	3 g
Galactose	5 g
Glycerin (reagent grade)	5 ml
Aquadest	1 liter

Larutkan semua bahan, kecuali agar sesuaikan hingga pH 7,3 ± 0,1, tambahkan agar, dan panaskan hingga larut. Campur hingga merata, pindahkan tiap-tiap 11 ml ke dalam tabung reaksi 16 x 150 mm, dan autoclave 121°C, selama 10 menit.

6 Polypeptone yeast extract medium

Polypeptone	20 g
Yeast extract	5 g
Sodium chloride	5 g
Aquadest	1 liter

Sesuaikan pH hingga 6,9 ± 0,1, pindahkan tiap-tiap 9 ml ke tabung reaksi bertutup 125 x 16 mm, dan sterilisasi 121°C, 15 menit. Panaskan di dalam air mendidih atau kukus hingga leleh untuk penambahan 18 larutan tes karbohidrat yang telah di filter.

7 *Saline agar base*

Agar murni	15,0 g
Sodium chloride	8,5 g
Aquadest	1 liter

Sesuaikan hingga pH 7,0, larutkan agar dan pindahkan 100 ml ke dalam botol berukuran. Autoclave selama 15 menit pada 121°C.

8 *Sporulation broth* (Untuk *C. Perfringens*).

Polypeptone (BBL)	15 g
Yeast extract	3 g
Soluble strach	3 g
Magnesium sulfate (tidak mengandung air)	0,1 g
Sodium thioglycollate	1 g
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	11 g
Aquadest	1 liter

Sesuaikan pH hingga 7,8 ± 0,1, pindahkan tiap-tiap 15 ml ke dalam tabung reaksi bertutup 150 x 20 mm, dan sterilisasi 15 menit, 121°C.

9 ***Tryptose - Sulfite - Cycloserine*** **(Tsc) Agar.**

Tryptose	15 g
Yeast extract	5 g
Soytone	5 g
Ferric ammonium citrate (*NF Brown Pearls*)	1 g
Sodium bisulfite (meta)	1 g
Agar	20g
Aquadest	900 ml

Sesuaikan pH hingga 7,6 ± 0,1, pindahkan tiap 250 ml ke dalam labu berukuran 500 ml, dan sterilisasi 121°C, 15 menit. Sebelum dituang ke petridish, tambahkan 20,0 ml larutan *D-cycloserine* 0,5% yang telah di filter-sterilisasi ke tiap 250 ml medium *agar* di atas yang telah dilelehkan. Untuk membuat petri yang mengandung *egg yolk* (kuning telur), tambahkan 20 ml *egg yolk* emulsium ke 250 ml medium steril yang mengandung *D—cycloserine.* Pindahkan tiap 15 ml ke dalam petridish 100 x 15 mm steril. Tutup petri dengan handuk dan biarkan kering selama semalam pada suhu ruangan sebelum digunakan.
Larutan *D-Cycloserine.*
Larutkan 1 g *D-cycloserine* tanpa pemanasan dalam 200 ml *phosphate buffer* 0,05 m, pH 8,0 dan sterilisasi dengan membran filter 0,4 m.
Emulsi kuning telur.
Cuci telur segar dengan sikat kaku dan tiriskan. Rendam 1 jam dalam alkohol 70%. Secara septis pisahkan kuning telur dan campur dengan volume yang sama, NaCl 0,85% steril. Simpan pada suhu 4°C.

Lampiran 2 *Reagensia dan diluen*

1 Larutan *Buffered glycerin-Salt*

Glycerin (reagent grade)	200 ml
Dipotassium phosphate (kering)	12,4 g
Monopotassium phosphate (kering)	4 g
Sodium chloride	4,2 g
Aquadest	800 ml

Larutkan *sodium chloride* dengan sebagian air dan buat hingga 900 ml. Tambahkan *glycerin* dan *phosphates* . Sesuaikan hingga pH 7,2; autoclave 121°C, 15 menit.

2 Larutan *Hepes buffered salt*

N-2-Hydroxythylpiperazine N-2-ethane sulfonic acid (Hepes)	6 g
Sodium chloride	11,7 g
Aquadest	500 ml

Larutkan dan sesuaikan hingga pH 8,0 dengan $NaOH_2$ N. Simpan pada suhu 4°C.

3 Larutan *lecitovitellin (LV)*

Campur hingga homogen, kuning telur dengan 0,85% larutan garam (*saline*) sebanyak 250 ml yang telah diatur pHnya hingga 7,0, jernihkan dengan alat sentrifugal selama 20 menit pada 14.000 x e (disarankan pda suhu 5°C). Filter sterilisasi larutan yang jernih dan *Seitz filter* berukuran 250 ml, dan simpan pada suhu refrigerator. Filtrasi berjalan sangat lambat, sehingga siapkan hanya untuk sejumlah yang diinginkan (50—75 ml).

4 *Reagensia* tes *nitrit*

4.1 *Reagensia sulfanilic acid*

Sulfanilic acid	1 g
Acetic acid, 5 N	125 ml

4.2 *Reagensia—alpha—Napthylamine*

a-Napthylamine	1 g
Acetic acid, 5 N	200 ml

Untuk menyiapkan *acetic acid* 5 N, tambahkan 28,75 ml *glacial acetic acid* ke dalam 71,25 *aquadest.*

Pengujian dilakukan dengan menambahkan *reagensia* A dan B langsung ke kultur yang tumbuh pada medium cairan atau *semisolid*. Beberapa pekerja menyukai mencampur *reagensia* A dan B dengan volume yang sama, kemudian menambahkan 0,1 ml larutan

campuran tersebut, ke kultur. Beberapa menyarankan menambahkan 2 tetes *reagensia* A yang kemudian diikuti segera dengan menambahkan *reagensia* B. Terjadinya warna merah menunjukkan hasil yang positif, sedang kontrol harus negatif. Tes negatif harus diulang dengan menambahkan serbuk seng. Jika warna merah terbentuk, nitrat tidak direduksi.

Perhatian : Baru-baru ini telah dibuktikan bahwa α—*naphthylamine* sebagai zat karsinogenik. Oleh sebab itu, meskipun penggunaan kurang dari 1% yang masih diperbolehkan, tetapi zat ini sukar untuk didapat. Telah ditemukan bahwa N, N *dimethyl*—1—*napthylamine* (DM¯ANA) atau *Cleve's* (5-amino - 2 - *napthylene sulfonic acid*) dapat digunakan sebagai pengganti α -naphthylamine. Kesulitan yang dijumpai bahwa terjadi lebih lambat dengan DM - ANA dan warna mudah hilang dengan *Cleve's acid*.

5 *Diluen peptone water*

Peptone	1 g
Aquadest	1000 ml

Pindahkan ke dalam botol masing-masing 99 ± 1 ml atau 90 ± 1 ml setelah di autoclave selama 20 menit pada 121°C. pH akhir 6,8 ± 0,1.

Lampiran 3 Pewarnaan dan prosedur pewarnaan

Pewarnaan gram

1. Huckers crystal violet.

1.1 Larutan A

Crystal violet (mengandung 90% warna)	2 g
Ethyl alcohol (95%)	20 ml

1.2 Larutan B

Ammonium oxalate	0,8 g
Aquadest	80 ml

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan Baring melalui kertas penyaring kasar.

2. Gram's Iodine

Iodine	1 g
Potassium iodine	2 g
Aquadest	300 ml

Letakkan KI dalam mortar, tambahkan *iodine,* dan giling dengan alat penggiling selama 5—10 detik. Tambahkan 1 ml air dan giling, kemudian 5 ml air dan giling, lalu 10 ml dan giling. Pada saat ini KI dan *iodine* menjadi suatu larutan. Tuang dalam botol *reagensia*. Bilas mortas dan penggiling dengan air yang cukup hingga diperoleh volume 300 ml.

3. **Hucker's counterstain (Larutan stok)**

Safranin 0 (disertifikasi)	2,5 g
Ethyl alcohol (95%)	100 ml

Penggunaannya. tambahkan 10 ml larutan stok ke dalam 90 ml *aquadest*.

4. Prosedur pewarnaan

Fiksasi film yang kering karena diangin - anginkan dengan melewatkan film melalui api burner dengan cepat sebanyak 3 - 4 kali. Warnai film selama 1 menit dengan larutan *crystal violet ammonium oxalate*, dan cuci sebentar dengan air mengalir (jangan lebih dari 5 detik).

Bubuhkan Gram Iodine selama 1 menit. Cuci dengan air kran. Dekdorisasi dengan 95% *ethyl alcohol* sampai 15 dak ada lagi warna biru (sekitar 30 detik). Sebagai prosedur alternatif, rendam slide dengan alkohol, segera angkat, dan rendam lagi dengan alkohol,selama 10 detik.

Cuci, dan hilangkan kelebihan air, dan bubuhkan *safranin counterstain* selama 1 menit.

Beberapa, dari organisme-organisme gram negatif tidak dapat segera melepaskan warna setelah diadakan pewarnaan dengan *Hucker's crystal violet*. Bila bekerja dengan *gonococcus*, encerkan larutan *crystal violet* 1 : 5 dengan *aquadest* dan campur 1 bagian larutan *crystal violet* yang telah diencerkan tersebut. 4 bagian larutan *amonium oxalate*. Bila bekerja dengan *bakteria anaerob*, campur 1 bagian *Hucker's crystal violet* dengan 1 bagian *sodium bicarbonate* 1% segera sebelum pewarnaan.